研究用試薬

2012年12月3日 改定

『 レビス® アルブミン-ウシ 』取扱説明書

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]、並びに[Q&A](キットの蓋を開けた際に一番上にあるカード(13×10cm)に記載されたパスワードをご利用下さい)をご参照下さい。

1.使用目的

本キットはウシアルブミンを定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。本キットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 2 時間 30 分です。
●本キットは検体中のウシアルブミンを測定します。
●微量な検体(標準操作法は 100μ l)で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●標準品はウシ由来のものです。
●全ての試薬は溶液タイプです。

2.キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは製造月から 6 ヵ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

3.測定原理

本キットは標準品、検体を抗アルブミン抗体固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。1 時間のインキュベーションと洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体を加え、捕捉されたアルブミンとともに 1 時間インキュベートします。洗浄後、ウエルに残ったペルオキシダーゼを発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm(副波長 620nm)で比色測定されます。吸光度はアルブミン濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

4.注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
●使用済みの検体、使用した消耗品等は 1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
●ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
●ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温:20～25℃(実験台上またはインキュベータ内温度)を厳守して下さい。また、風速(エアコン風も含む):0.4m/sec(*①)以上、湿度

30%未満の環境下での測定は避けて下さい(9.技術上のヒントをご参照下さい)。
(*①)風速 0.4m/sec の目安は弊社 Web サイトの動画「反応条件」をご参照下さい。

5. 構成品

構　成　品	状　態	容　量
(A) 抗体固相化 96 ウエルプレート(乾燥プレートタイプ)	洗浄後使用	96 wells(8×12)/1 枚
(B)標準アルブミン溶液(ウシ)(500 ng/ml)	希釈後使用	200μ l/1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60ml/1 本
(D) ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体	希釈後使用	200μ l/1 本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12ml/1 本
(H) 反応停止液(1M H_2SO_4) ※取扱注意	そのまま使用	12ml/1 本
(Ｉ) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100ml/1 本
プレートシール		3 枚
取扱説明書		1 部

6.添付されていないが必要な器具　□チェックリスト

□精製水(蒸留水)
□標準溶液希釈用試験管
□洗浄液希釈用ガラス器具(メスシリンダー・ビーカー・瓶)
□チップ交換型ピペット(使い捨てチップで 50μ l を正確にピペッティングできるもの、及び 50～500μ l を正確にピペッティングできるもの)
□連続分注ピペット(例 Eppendorf の multipette plus)、100μ l を連続分注できるもの
□ペーパータオル等の吸水性のあるもの(洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
□撹拌器(Vortex タイプ)
□マイクロプレート振とう器(約 600～1,200 rpm)
□96 ウエルプレート用洗浄機(あれば好ましい)または噴射ビン(弊社 Web サイトの動画「洗浄操作」をご参照下さい。)
□96 ウエルプレートリーダー(450 ±10 nm 、620nm:600～650nm)
□データ計算用ソフトウェア

7.試薬の調製

＊キットの試薬は使用前に必ず室温(20～25℃)に戻して下さい(2 時間位が目安です)。
＊5.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「濃縮液」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい(ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

[(B)標準アルブミン溶液(ウシ)(500 ng/ml)];標準曲線作製用

(B)標準アルブミン溶液(ウシ)(500 ng/ml)(原液)と(C)緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。
下記は一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度(ng/ml)
原液 50μ l	450μ l	50
50 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	25
25 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	12.5
12.5 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	6.25
6.25 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	3.13
3.13 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	1.56
1.56 ng/ml 溶液 250μ l	250μ l	0.78
0(ブランク)	250μ l	0

［(D)ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体］

200μｌを充分分取できる量をご提供しています。 **濃縮液を(C)緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**

［(I)濃縮洗浄液(10×)］

濃縮洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して下さい。

例：100ml の濃縮洗浄液（10×）＋900ml の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

【試薬の安定性と保存方法】

(A)抗体固相化 96 ウエルプレート

未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(B)アルブミン標準溶液（ウシ）(500 ng/ml)

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C)緩衝液及び(F)発色液(TMB)

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(D)ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H)反応停止液(1M H_2SO_4)

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(I)濃縮洗浄液(10×)

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

8.技術上のヒント

- ●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。
- ●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ●反応停止液は使用するまでは無色です。
- ●やむを得ず、測定操作を、風速：0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。

例）インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社 Web サイトの動画**「反応条件」**でご確認下さい。

9.検体の調製

本キットは検体（培養液等）中に微量に存在するウシアルブミンを検出・定量するのに適しております。検体の pH は 6.5～8.0 の範囲内に入るように調製して下さい。本キットはウシ血清・血漿検体を測定するには鋭敏すぎることにご注意下さい。およそ 100 万倍に希釈する必要があります。測定範囲（0.78～50 ng/ml）に入るよう、キットの緩衝液を用いて検体を希釈して下さい。検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管等を用いて緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。

- ●検体は定法にしたがって採取しすぐに測定するか、－35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に撹拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
- ●溶血した検体や高脂質検体は使わないで下さい。
- ●濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
- ●妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。

【検体の安定性と保存方法】

検体を長期に保管する場合は、−35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。また、検体の希釈は用時調製として下さい。

ポジティブ検体による測定検体の適合性テスト

これから測定されようとしている検体が本キットの検体としての条件を満たしているかどうかを調べることは、万一期待された測定結果が出なかった場合の原因究明に役立ちます。一般的に測定検体は様々です。例えば、採血の際の麻酔の有無、麻酔薬の種類、血漿を採取する場合に使用した抗凝固剤、検体が常温、低温で放置されていた間に起きた炭酸ガスの消失とpHの上昇、保存剤として加えられた薬物、保存中に起きた血液成分の濃縮、変性などの要因が測定検体には加わっています。このような要因の為に測定検体が本キットの反応系に影響していないかどうかを、できればアッセイ毎に調べたいものです。

<u>実行方法</u>

適当に選んだ代表的検体、例えば対象群の検体の一つから 90μ l(*②)を小試験管に採り分けます(採った検体の番号を記録しておいて下さい。仮に No. C とします)。次に標準溶液の系列から最高濃度の溶液を 10μ l 採って小試験管内の検体に加え、よく撹拌します。こうして作製した標準品入りの検体をポジコンとして他の検体と共に測定します。この測定値を検体 No. C の測定結果と比べて見て下さい。もしも、No. C の測定値が A ng/ml であったとすると標準品入り検体の測定値は測定精度の範囲内で、A ×0.9＋(最高標準溶液濃度×0.1)ng/ml になっている筈です。要するに簡単な添加回収試験を行っている訳です。測定検体がこの条件を満足していれば、本キットの測定系が検体に対して満足に機能していることが証明される訳です。

(*②)90μ l がピペットの都合で採取できない場合は 100μ l 採っても結構です。それに標準溶液 10μ l を加えた場合、期待測定値は、A ×0.91＋(最高標準溶液濃度×0.09)になる筈です。検体が少なくて 90μ lは無理だという場合には、(50μ l＋5μ l)の組み合わせでも良いでしょう。もっと少量の組み合わせではピペットの精度の問題があって測定値の信頼性が疑問になります。

10.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

抗体固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

(1) あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄(*③)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(2) 標準品測定ウエルに各濃度のアルブミン標準溶液を、検体用ウエルに検体をそれぞれ **100μ l** ずつ分注します。
(3) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*④)します。
(4) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(＊⑤)します。
(5) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、4 回洗浄(*③)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(6) 各ウエルにペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体を **100μ l** ずつ分注します。
(7) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*④)します。
(8) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(＊⑤)します。
(9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 4 回洗浄(*③)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(10) 各ウエルに発色液を **100μ l** ずつ分注します。
(11) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*④)します。
(12) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 30 分間静置(＊⑤)します。
(13) 各ウエルに反応停止液を **100μ l** ずつ分注し、発色反応を停止します。
(14)撹拌(*④)後マイクロプレート用分光光度計で 450nm(副波長 620nm)での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。

(＊③)、(＊④)、(＊⑤)測定手順概要(7 ページ)をご参照下さい。

ワークシート（例）

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	50 ng/ml	ポジコン	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32
B	25 ng/ml	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
C	12.5 ng/ml	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
D	6.25 ng/ml	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
E	3.13 ng/ml	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
F	1.56 ng/ml	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
G	0.78 ng/ml	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
H	0	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39

11.計算

(1)測定毎に標準曲線を作製します。両対数を使用しX軸を標準溶液濃度（ng/ml）、Y軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照下さい。

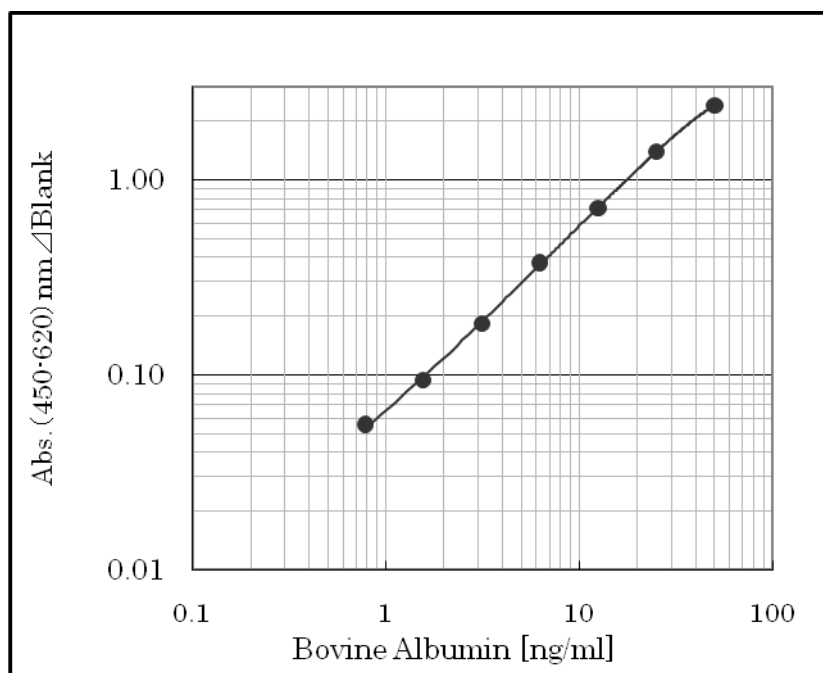
(2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(ng/ml)を読み取ります。

読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。

＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は(C)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。

＊一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお薦め致します。

＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。

＊プレートリーダーは SUNRISE RAINBOW(TECAN)を使用。グラフは標準曲線例です。
吸光度は、測定環境により変動します。

12.キットの性能

●測定範囲

ウシアルブミンを 0.78～50 ng/ml の範囲で測定できます。

●特異性

この ELISA 系で使用されている抗体はウシアルブミンに対して特異的です。
関連物質を本キットで測定した結果は次表のとおりです。

検体名	交差性	検体名	交差性
ウシ アルブミン	100%	ラット アルブミン	0.05%以下
マウス アルブミン	0.05%以下	ヒト アルブミン	0.05%以下

交差性は、1,000 ng/ml 時のデータです。

●精度試験（アッセイ内変動）（5 重測定、4 検体）　　平均 C.V.値は 5%未満
●再現性試験（アッセイ間変動）（3 重測定、3 検体、4 日間）　　平均 C.V.値は 5%未満
●添加回収試験

2 血清検体に異なる 3 濃度のアルブミンを添加し測定した結果、回収率は 91%から 104%でした。

●希釈直線性

2 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 4 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は 0.9977 と 0.9996 でした。

13.トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い

可能な解釈
1)標準品や検体の入れ忘れ。
2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3)発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4)酵素阻害剤の混入。
5)キット保管温度の影響（凍結した場合）。
6)プレートの過剰な洗浄。
7)発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度（0.78 ng/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。

可能な解釈･･･　洗浄が不適当、不完全であった。
（ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。）

●変動係数（CV）が大きい

可能な解釈
1)洗浄が不適当、不完全であった。
2)標準品や管理血清、または検体の撹拌が不充分であった（凍結検体の撹拌は充分に行って下さい）。
3)ピペッティング操作が一定ではなかった。

●Q-1 ：キットは分割して使用することができますか？
A-1 ：できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。
●Q-2 ：プレートを取り出したらウエルの中に何も入っていませんでしたが大丈夫ですか？
A-2 ：大丈夫です。このキットは乾燥プレートタイプです。
●更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧下さい。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)] 並びに「Q&A」をご参照下さい。

- □ ウエルプレート、試薬類を充分に室温(20～25℃)に戻して下さい。室温化には 2 時間位必要
- □ 濃縮洗浄液の希釈 ：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。
- □ 標準溶液の希釈(例)：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。

希釈例	濃度(ng/ml)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
	標準溶液(μl)	**原液：50**	250*	250*	250*	250*	250*	250	0
	緩衝液(μl)	450	250	250	250	250	250	250	250

＊：ひとつ高濃度の標準溶液

- □ ポジティブ検体の作製

	操作	各操作注意事項並びに関連情報
□	**抗体固相化 96 ウエルプレート（乾燥プレートタイプ）**	
□	↓洗浄 4 回（＊③）	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
	検体または標準溶液 100μl	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊⑤) ⇨	第一反応「反応条件」の動画参照
□	ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体の希釈 室温化された緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。	希釈溶液の調製は第一反応中に行う
□	↓洗浄 4 回（＊③）	洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体** 100μl	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊⑤) ⇨	第二反応「反応条件」の動画参照
□	↓洗浄 4 回(＊③)	洗浄液除去後、直ちに発色液分注
□	**発色液(TMB)** TMB が室温化されていることを確認 100μl	分注後、濃度により青色に変色
□	↓撹拌(＊④)、室温(20～25℃)、30 分間反応、静置(＊⑤)	
□	**反応停止液(1M H_2SO_4)** 強酸性につき取扱注意 100μl	分注後、濃度により黄褐色に変色
□	↓撹拌(＊④)	直ちに撹拌
□	**吸光度測定(主波長 450nm、副波長 620nm:600～650nm)**	副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

（＊③）**洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。**4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300μl／ウエルです。万一、最小標準溶液濃度（0.78 ng/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5～25ml／分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウエル間のコンタミに注意して下さい。「洗浄操作」の動画をご参照下さい。

（＊④）撹拌の目安は 600～1,200rpm-10 秒間、3 回。「撹拌操作」の動画をご参照下さい。

（＊⑤）撹拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。「反応条件」の動画をご参照下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】____________________

【所属】____________________

【測定者】__________ 【測定日】__________

【キットロット番号】__________ 【有効期限】__________

【備考】____________________

【製品名】；レビス® アルブミン−ウシ

【コード番号】；AKRBS-018

【英語表記】；Bovine Albumin ELISA KIT(AKRBS-018,Shibayagi,Gunma,Japan)

【お問い合せ先】

製造／発売元；株式会社　シバヤギ

〒377-0007　群馬県渋川市石原 1062-1

TEL.0279-25-0279　　FAX.0279-23-0313

<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp

<URL>http://www.shibayagi.co.jp